

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

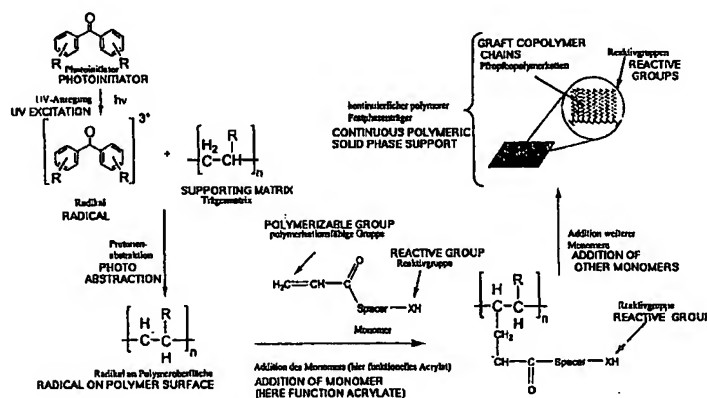


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|---|-----------|--|
| <p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C08F 255/02, C07K 1/04, C08F 259/08, 291/18, C08J 7/18</p> | <p>A1</p> | <p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/12575</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 2000 (09.03.00)</p> |
| <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06294</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 28. August 1999 (28.08.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 40 541.3 28. August 1998 (28.08.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): JERINI BIO TOOLS GMBH [DE/DE]; Rudower Chaussee 29, D-12489 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ULBRICHT, Mathias [DE/DE]; Landsberger Allee 89, D-10407 Berlin (DE). VOLKMER-ENGERT, Rudolf [DE/DE]; Dubliner Strasse 8, D-13349 Berlin (DE). GERMEROTH, Lothar [DE/DE]; Hohenzollerndamm 7, D-10717 Berlin (DE). WENSCHUH, Holger [DE/DE]; Wolfsgartenstrasse 25, D-12555 Berlin (DE).</p> | | <p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p> |

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYMERIC SOLID PHASE SUPPORTING MATERIALS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG POLYMERER FESTPHASENTRÄGER



(57) Abstract

The invention relates to a method for synthesizing continuous, polymeric solid phase supporting materials with spatially defined and interspaced reaction sites. The solid phase supporting material is comprised of a supporting matrix and graft copolymer chains with reactive groups. The surface of the supporting matrix is coated with a photoinitiator. The supporting matrix and the photoinitiator are exposed in the presence of an unsaturated functional monomer. The monomer comprises a spacer, a polymerizable group, and a reactive group. Compounds such as amino acids can subsequently react with the reactive group in a parallel and combinatorial synthesis and are then lengthened to form peptides.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von kontinuierlichen, polymeren Festphasenträgern mit räumlich definierten und voneinander getrennten Reaktionsorten. Der Festphasenträger besteht aus einer Trägermatrix und Pfropfcopolymerketten mit Reaktivgruppen. Die Oberfläche der Trägermatrix wird mit einem Photoinitiator beschichtet. Die Trägermatrix und der Photoinitiator werden in Gegenwart eines ungesättigten funktionellen Monomers belichtet. Das Monomer besitzt einen Spacer, eine polymerisationsfähige Gruppe und eine Reaktivgruppe. Mit der Reaktivgruppe können danach in paralleler und kombinatorischer Synthese Verbindungen, wie Aminosäuren, reagieren, die dann zu Peptiden verlängert werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | | | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | ML | Mali | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MN | Mongolei | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MR | Mauretanien | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MW | Malawi | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | MX | Mexiko | | |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CM | Kamerun | | | PL | Polen | | |
| CN | China | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CU | Kuba | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CZ | Tschechische Republik | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| DE | Deutschland | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DK | Dänemark | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| EE | Estland | LR | Liberia | SG | Singapur | | |

Verfahren zur Herstellung polymerer Festphasenträger

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von kontinuierlichen polymeren Festphasenträgern zur simultanen kombinatorischen Synthese von organischen Verbindungen mittels SPOT-Synthesetechnologie, bestehend aus einer polyolefinischen Trägermatrix und einzelnen Ketten eines Pfropfcopolymers, die durch heterogene photoinitierte Pfropfcopolymerisation von Acrylat-, Vinyl- und Allylmonomeren auf der gesamten Oberfläche des Trägerpolymers synthetisiert werden und Hydroxyl-, Carboxyl-, Amino-, Mercapto-, Aldehyd-, oder Halogen-Reaktivgruppen enthalten, die zur weiteren Derivatisierung genutzt werden können.

Beschreibung des Standes der Technik

Die chemische Synthese von Verbindungen unter Verwendung des Konzeptes kombinatorischer Bibliotheken hat einen bedeutenden Einfluß auf den Prozeß der Entwicklung potentieller Kandidaten für neue Therapeutika und Diagnostika. Kombinatorische Chemie ist eine Technik, bei der eine große Anzahl strukturell unterschiedlicher Verbindungen unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen kosten- und zeiteffektiv hergestellt und nachfolgend Hochleistungs-Screeningassays zur biologischen Testung zugeführt werden kann. Dabei nimmt die Weiterentwicklung von Merrifields Festphasensynthesestrategie [Merrifield, R.B.: J. Am. Chem. Soc. 1963, 85, 2149], ursprünglich für die Synthese von Peptiden eingeführt, eine Schlüsselposition ein. Da die Verwendung überschüssiger Reagenzien nahezu vollständige Reaktionen möglich macht, die Methodik leicht zu automatisieren ist und biologische Testsysteme auch direkt auf den polymeren Oberflächen anwendbar sind, wird die kombinatorische Chemie bevorzugt an fester Phase durchgeführt.

Die Modifizierung und Weiterentwicklung der ursprünglichen Polystyren- und später eingesetzten Polyamidträgersysteme [Atherton, E.; Clive, D.L.J.; Sheppard, R.C.: J. Am. Chem. Soc. 1975, 97, 6584] führten zu neuen Polymeren, wie z.B. Tentagel- und PEGA- Harzen [Rapp, W.; Zhang, L.; Häbich, R.; Bayer, E. In Peptides 1988, (G. Jung & E. Bayer, Eds.) Walter de Gruyter, Berlin, New York, S.199; Meldal, M.; Tetrahedron Lett. 1992, 33, 3077]. Diese wurden zunehmend auch zur Festphasensynthese nichtpeptidischer Substanzen eingesetzt. Obwohl sphärische Harzkügelchen aus unterschiedlichen Materialien weit verbreitet sind, haben andere physikalische Erscheinungsformen wie Stäbchen (Polyethylen) oder kontinuierliche Oberflächen (Zellulose, Baumwolle, Glas, Polyolefine) zu neuen Synthesetechniken geführt.

Ein solches Synthesekonzept ist die Methode der Spatially Addressable Combinatorial Libraries [Review: Pirrung, M.C.; Chem. Rev. 1997, 97, 473]. Ein entscheidender Vorteil solcher Substanzbibliotheken besteht darin, daß die Position, an der sich ein synthetisiertes Molekül auf dem Polymer befindet, seine Zusammensetzung beschreibt. Somit kann bei Verwendung von in Format und Struktur geeigneten Trägermaterialien die Anwendung kompatibler biologischer Testsysteme direkt zu Informationen bezüglich der biologischen Aktivität der synthetisierten Substanzen führen.

Somit haben das Erscheinungsbild, die chemischen sowie physikalischen Eigenschaften und die Oberflächenfunktionalisierung der Trägermaterialien einen entscheidenden Einfluß sowohl auf die Qualität und Effizienz der Synthese als auch auf die Kompatibilität mit biologischen Testsystemen.

Die von Frank [Frank, R.; Tetrahedron, 1992, 48, 9217] entwickelte SPOT-Technologie zum Aufbau von Peptiden an planaren Zelluloseoberflächen ermöglicht dabei in besonderem Maße den effizienten parallelen Aufbau großer Zahlen von Peptidsequenzen. Die Methode, bei der die Reagenzien örtlich adressiert auf den kontinuierlichen Träger pipettiert werden, zeichnet sich desweiteren durch eine Anwendbarkeit von herkömmlichen Screeningassays aus, da die

Auslesegeometrien der Hochleistungstestsysteme kompatibel mit den flächigen Trägermaterialien sind. So konnten beispielsweise SPOT-Arrays, neben dem klassischen Epitopmapping, eingesetzt werden, um optimale Bindungssequenzen von Proteinkinasen bzw. metallbindende Peptide zu entdecken [Tegge, W.; Frank, R.; Hofmann, F., Dostmann, W.R.G.; Biochemistry 1995, 34, 10569; Malin, R.; Steinbrecher, R.; Jannsen, J.; Semmler, W.; Noll, B.; Johannsen, B.; Frömmel, C.; Höhne W.; Schneider-Mergener, J.; J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 11821].

10 Aufgrund der limitierten chemischen und mechanischen Stabilität der Zellulosemembranen ist die Technologie bisher jedoch auf die Herstellung von Peptidsequenzen, die unter relativ milden Synthesebedingungen erfolgt, beschränkt.

15 Bedingt durch die Struktur des chemisch homogenen Trägers und die Nutzung von Hydroxygruppen als Reaktivgruppe führt der permanente Überschuss an Hydroxyfunktionalität auf der Zelluloseoberfläche dazu, daß selektive bzw. vollständige Umsetzungen nicht zu erreichen sind. Dies ist besonders für die Generierung unterschiedlicher Linkerkonstrukte ein Nachteil, was die Vielfalt möglicher Reaktionen entscheidend einschränkt.

20 Einige Entwicklungen auf dem Gebiet von flächigen Trägermaterialien könnten u.U. die Nachteile der Zellulose bei der SPOT-Synthese überwinden, sind jedoch bisher nicht in der SPOT-Synthesetechnik angewandt worden.

25 So beschreiben die Patente von Berg et al. (WO 90/02749, WO 91/13098) und Batsberg et al. (WO 95/00533) die Verwendung von Polyolefinfilmen (vorzugsweise Polyethylen). Diese wurden durch γ -Strahlen oder mittels chemisch initiiertter Pfropf- und Homopolymerisation von Styren aus alkoholischen Lösungen modifiziert. Eine weitere chemische Derivatisierung zur Einführung von Reaktivgruppen folgte. Die so erzeugten Träger wurden in Reaktoren zur Peptid- und Oligonukleotidsynthese verwendet. Außerdem konnten Festphasenassays (ELISA) durchgeführt werden.

30 Obwohl die Pfropfung von Polystyrenketten eine logische Weiterentwicklung des klassischen Merrifield-Harzes zu einem flächigen Träger unter Beibehaltung der herkömmlichen Peptidsynthesebedingungen ist, ist die Auswahl dieses Polymers in diesem Kontext nicht zwingend. Sie bringt im Gegenteil sogar Nachteile, wie z.B. die stark unterschiedliche Solvation der Ketten in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Desweiteren ist Polyethylen als bevorzugtes Basispolymer mechanisch wenig stabil, und die beschriebenen Filme bzw. anderen Formkörper sind generell nicht porös. Die mögliche Funktionalisierung ist damit auf die äußere Oberfläche beschränkt (d.h. dicke oder dünne Pfropfschicht), was zu einer geringen Beladungskapazität führt. Eine oberflächenselektive Funktionalisierung ist nicht gewährleistet.

40 Durch die Wahl von γ -Strahlung zur Initiierung und insbesondere des Monomer/Lösungsmittelsystems werden zwar zusätzlich auch Reaktionen (z.B. Pfropf- und Homopolymerisation) im Polyolefinfilm ausgelöst, diese verstärken jedoch lediglich die mechanische Instabilität und verursachen eine Trübung, die die Anwendung in Assays behindert.

45 Weiterhin wurden von Hudson et al. (WO 94/05394) neben der Verwendung von porösen Sinterplatten auch mit Aminogruppen funktionalisierte Polypropylenmembranen beschrieben, an die über einen Spacer (PEG) ein hydrophiles Polymer (Dextran, partiell hydrolysiertes Chitin) kovalent gekoppelt ist. Die in kleinen Reaktoren (Rasterplatten mit Löchern) verwendeten hydrophilen Träger besitzen eine einheitliche Reaktivität und eignen sich gut für Screeningzwecke. Allerdings ist die harsche Primärmodifizierung via Chromoxidation besonders mit Hinblick auf den Einsatz von porösen Trägern (mit größerer spezifischer Oberfläche und damit empfindlicher Morphologie) nachteilig. Deshalb lassen sich die Membranen offensichtlich nur aufgrund der Fixierung in der Rasterplatte, d.h. als diskontinuierlicher Träger, handhaben.

50

Desweiteren führt die relativ aufwendige Konstruktion der Synthesevorrichtung zu einer streng limitierten Kapazität und Variabilität der einzelnen Syntheseareale.

Das Patent von Köster et al. (EP 0305929) beschreibt die Synthese von Peptiden und Oligonukleotiden an porösen Membranpolymeren, an denen durch strahlungsinitiierte Radikalerzeugung Reaktivgruppen auf der Oberfläche erzeugt wurden. Die Funktionalisierung über (aufgrund der Auswahl von Initiator und Monomeren) unterschiedlich stark vernetzte Polymerschichten kann jedoch zu ungleichmäßigen Zugänglichkeiten der funktionellen Gruppen führen. Damit erscheinen diese Membranen für die SPOT-Synthese als unzuverlässig. So ist die Eignung großer Flächen für Synthese und Bioassays (die Stabilität und gleiche Zugänglichkeit aller Reaktivgruppen erfordern) nicht erkennbar. Generell sind Komplikationen bei der Festphasensynthese von längeren oder/und komplizierteren Sequenzen zu erwarten.

Coassin et al. (WO 95/09176) berichten über eine Polymerfunktionalisierung (Polypropylen) mit geeignetem Reaktivplasma (z.B. Ammoniak), um zu Filmen bzw. Membranen als Träger für die Synthese bzw. Sequenzierung von Biomolekülen zu kommen. Die Funktionalisierung wird jedoch von Nebenreaktionen (Oxidation) begleitet, die die mechanische Stabilität des Trägers deutlich verschlechtern. Außerdem ist die Plasmafunktionalisierung bekanntermaßen wenig chemoselektiv. Das Resultat ist eine geringe Beladung mit Reaktivgruppen, da die Modifizierung nur oberflächlich erfolgt und die Flüsse von Ladungsträgern und reaktiven Spezies (bei reaktiven Plasmen) wegen der Degradationseffekte (s.o.) minimiert werden müssen.

Großflächige kontinuierliche Träger wurden auch von Eichler (DD 272855A1), Lebl et al. (EP 0385433 A2, EP 0445915 A1) und Okrongly et al. (EP 0400920) beschrieben. Während sich die beiden ersten Patente auf die Modifizierung an Zellulose mit den bekannten Nachteilen beziehen, werden im letzteren vorzugsweise Mikrotiterplatten (Polystyren) für die Peptidsynthese oberflächenfunktionalisiert. Einer vorteilhaften Kontrolle des Reaktionsablaufes mittels UV-Spektroskopie stehen hier jedoch die Nachteile einer begrenzten Bindungskapazität sowie einer eingeschränkten Beweglichkeit der Zielmoleküle, jeweils wegen der Beschränkung der Funktionalisierung auf eine einfache polymeranaloge Reaktion an der nichtporösen Polystyrenoberfläche, gegenüber.

Alle bislang bekannten Systeme (funktionelle Träger & Synthesebedingungen) haben aus Sicht der Anforderungen der SPOT-Synthese jeweils spezielle gravierende Nachteile, die eine effektive Anwendung verhindern. Insbesondere die Erweiterung der Anwendung der SPOT-Synthese für die Generierung von organisch-chemischen Substanzbibliotheken ist mit bekannten kontinuierlichen Festphasenträgern nicht möglich. Diese Nachteile bzw. Limitierungen werden mit der im folgenden beschriebenen Erfindung überwunden.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Synthese von kontinuierlichen polymeren Festphasenträgern mit räumlich definierten und voneinander getrennten Reaktionsorten, umfassend eine Trägermatrix und Pfropfcopolymerketten mit Reaktivgruppen, die mit organischen Verbindungen reagibel sind, mit folgenden Syntheseschritten:

- i.) Beschichten der Oberfläche der Trägermatrix mit einem Photoinitiator, welcher nach UV-Anregung, durch Wasserstoffabstraktion und damit i.w. ohne Polymerdegradation in der Matrix, an der Polymeroberfläche Radikale erzeugt,
 - wobei die Trägermatrix zur Gruppe mindestens einer der polymeren polyolefinischen Basispolymere gehört: Polypropylen, Polyethylen, Polyvinylidenfluorid, Polytetrafluorethylen oder vernetztes Polystyren, bevorzugt Polypropylen
 - wobei der Photoinitiator ein Benzophenonderivat oder Keton ist,
- ii.) Belichten der mit Photoinitiator beschichteten Trägermatrix in Gegenwart eines ungesättigten funktionellen Monomers mit UV-Strahlung,

- wobei das funktionelle Monomer eine Spacergruppe umfaßt, welche kovalent über eine Amid-, Ester-, Ether-, Disulfid- oder CC-Gruppe sowohl mit einer Reaktivgruppe als auch mit einer polymerisationsfähigen Gruppe verbunden ist, (α) dabei ist der Spacer ein Oligo- oder Polyethylenglykol oder eine Bindung,
- 5 (β) dabei ist die polymerisationsfähige Gruppe ein Acrylat-, Vinyl- oder Allylmonomer,
- (γ) dabei ist die Reaktivgruppe, die mit organischen Verbindungen reagibel ist, eine Hydroxylgruppe, Carboxylgruppe, Aminogruppe, Mercaptogruppe oder eine Halogengruppe,
- 10 (δ) dabei kann gegebenenfalls eine Bindung zwischen Reaktivgruppe und Spacer bzw. zwischen Spacer und polymerisationsfähiger Gruppe hydrolytisch oder oxidativ/reduktiv gespalten werden.
- iii.) Bildung von Pfropfcopolymerkettens durch kovalente Bindung der polymerisationsfähigen Gruppe der funktionellen Monomere an der Trägermatrix, wobei zunächst ein Monomer an ein Radikal der polymeren Trägermatrix addiert und dann an dieses Monomer weitere Monomere im Sinne einer Polymerisation addiert werden,
- 15 iv.) Extraktion von nicht umgesetzten funktionellem Monomer und Photoinitiator, sowie von löslichen Folgeprodukten.
- 20

Beschreibung der Erfindung

25 Inhalt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von neuartigen polymeren Oberflächen, an denen organische Substanzbibliotheken unter Verwendung des SPOT-Synthesekonzeptes hergestellt werden können, deren biologische Aktivität direkt auf dem Träger evaluiert und ausgelesen werden kann.

30 Erfindungsgemäß werden oberflächenfunktionalisierte Festphasenträger synthetisiert, die die in der Beschreibung des Standes der Technik aufgezeigten nachteiligen Eigenschaften vorhandener Träger überwinden bzw. durch neue Funktionalisierungsstrategien völlig alternative Synthesekonzepte und -techniken der kombinatorischen Synthese möglich machen.

35 Für die speziellen Anforderungen der SPOT-Synthese sind die guten mechanischen Eigenschaften (Stabilität) des Trägers und eine wohldefinierte Oberflächenfunktionalität gleichermaßen wesentlich. Allerdings gibt es keine homogenen Materialien, die beide Eigenschaften a priori miteinander vereinen. Das Beispiel der chemisch homogenen Zellulose, wo bei der Anwendung als fester, hydroxyl-reaktiver Träger immer wieder neue potentielle Hydroxyl-Reaktivgruppen aus der Kohlenhydratmatrix hervorkommen, lehrt vielmehr, daß ein optimaler Träger chemisch heterogen sein sollte. Eine Trägermatrix, die i.w. die Stabilität bedingt, mit einer chemisch verschiedenen funktionellen Oberfläche. Folglich stellt die heterogene Funktionalisierung von geeigneten polymeren Matrixmaterialien den attraktivsten Syntheseweg für neue, leistungsfähigere kontinuierliche polymere Festphasenträger dar. Wenn es gelingt, diese Funktionalisierung wirklich oberflächenselektiv zu führen, d.h. die chemische

40 Umwandlung des Matrixpolymers auf dessen Oberfläche zu beschränken, dann können Trägermatrix und funktionelle Trägeroberfläche unabhängig voneinander optimiert werden.

45

Die Anforderungen an die Trägermatrix resultieren daraus, daß eine gute, sichere Handhabbarkeit vor, während und nach den Multischritt-Synthesen entscheidend für Erfolg bzw. Qualität von Synthesen und Assays sind. Andererseits ist eine große spezifische Oberfläche in Kombination mit geeigneter Porenstruktur der Trägermatrix die Voraussetzung für eine hohe Bindungskapazität pro Fläche. Eine hinreichende Dimensionsstabilität (minimale Quellung) muß aber auch gegeben sein, um eine Repositionierung der Membran während der Synthesen und definierte Produkte in jedem Spot zu erhalten und die Assayergebnisse unverfälscht auslesen zu

50

können. Alle diese Anforderungen bedingen, daß die Trägermatrix -trotz gewünschter großer spezifischer Oberfläche- eine ausgezeichnete mechanische, thermische und Lösungsmittelbeständigkeit unter Synthese- und Assaybedingungen aufweisen muß.

- 5 Die Anforderungen an die funktionelle Oberfläche hinsichtlich der Synthese sind
Reaktivgruppen in großer Menge (mindestens bis zu $1 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) und mit guter, konstanter
Zugänglichkeit (über alle Synthesestufen für die Zielmoleküle). Das erfordert eine große
spezifische Oberfläche in Kombination mit geeigneter Porenstruktur der Trägermatrix (s.o.)
sowie Reaktivgruppen an Spacergruppen oder -ketten, eine gute Solvation der
10 Funktionalgruppen und eine optimale Benetzung der äußeren Trägeroberfläche (definierte Spots
mit minimalen radialen Konzentrationsgradienten; keine Chromatographieeffekte). Dadurch
werden eine hohe Produktreinheit (pro Spot) und identische Produktmengen für alle Spots
erhalten.

- 15 Hinsichtlich der Assays sind weiterhin die Zugänglichkeit und Beweglichkeit der synthetisierten
Moleküle sowie minimale unspezifische Wechselwirkungen der funktionellen Oberfläche mit
den Testproteinen (minimaler Hintergrund beim Auslesen des Ergebnisses) wesentlich.

- Das Herstellungsverfahren soll robust, reproduzierbar und flexibel in Bezug auf die
20 Funktionalität und ggf. auch die Trägermatrix sein sowie ein problemloses Up-scaling auf große
Flächen ermöglichen. Für das Syntheseprodukt, die neuen kontinuierlichen polymeren
Festphasenträger, sind insbesondere die Homogenität und die Stabilität von Trägermatrix,
funktioneller Schicht und deren Komposit unter Synthese- und Assaybedingungen kritisch.

- 25 Synthese der neuen kontinuierlichen polymeren Festphasenträger

- Ein als Trägermatrix besonders gut geeignetes Polymer ist Polypropylen, da es in weiten
Bereichen von potentiellen organisch-chemischen Synthesebedingungen (einschließlich
Lösungsmittel und Temperatur) mechanisch belastbar und chemisch stabil ist. Auch eine
30 Quellung tritt, von sehr unpolaren Lösungsmitteln abgesehen, die aber für die Synthese keine
Rolle spielen, kaum auf. Polypropylen ist sowohl als dünner, homogener, transparenter Film, als
dicke Folie oder Platte, aber auch als poröse Membran mit unterschiedlichen Porenmorphologien
und -größen verfügbar. Je nach Zielstellung (gewünschte Kapazität - spezifische Oberfläche;
mechanische Flexibilität) können aus diesem Spektrum Basismaterialien für die Synthese von
35 Festphasenträgern gewählt werden. Vorzugsweise werden makroporöse Flachmembranen aus
Polypropylen (z. B. Mikrofiltrationsmembranen, hergestellt durch Phaseninversion und mit
schwammartigem Porennetzwerk mit nominalen Porengrößen/Trenngrenzen von $0.2 \mu\text{m}$, oder
Filter, mit einer gesponnenen und gesinterten vliesartigen Netzwerkstruktur mit nominalen
Porengrößen/Trenngrenzen von $0.6 \mu\text{m}$) als Trägermatrix gewählt. Selbstverständlich können
40 auch andere Polymere, wie z.B. Polyethylen, Polyvinylidenfluorid, vernetztes Polystyren oder
Teflon, mit unterschiedlichen Morphologien eingesetzt werden. Die Trägermatrix kann auch
extern bzw. intern durch einen zusätzlichen inerten Träger bzw. Partikel, Fasern oder Netzwerke
aus Polymer, Glas oder Metall verstärkt werden.

- 45 Um eine maximale Stabilität unter Anwendungsbedingungen zu gewährleisten, wird ein
Komposit aus der Trägermatrix und einer daran chemisch verankerten funktionellen Schicht
synthetisiert. Die Trägermatrix wird vorzugsweise durch photoinitierte heterogene
Pffropfcopolymerisation (streng oberflächenselektiv bezüglich der Polypropylenmatrix, aber über
die gesamte Schichtdicke nahezu gleichmäßig) mit langen Pffropfpolymerketten aus
50 funktionellen Monomeren kovalent funktionalisiert. Die erfindungsgemäßen neuen
kontinuierlichen polymeren Festphasenträger für die SPOT-Synthese werden dabei nach einem
Verfahren erhalten, das aus folgenden wesentlichen Schritten besteht:

- i) Oberflächenbeschichtung der Trägermatrix mit einem Photoinitiator, der nach UV-Anregung (durch Wasserstoffabstraktion und damit ohne Matrixpolymerdegradation) an der Trägersoberfläche Radikale erzeugen kann,
- 5 ii) UV-Belichtung der beschichteten Trägermatrix in Gegenwart eines funktionellen Monomeren oder Monomergemisches unter Bildung einer funktionellen Schicht, die aus am Matrixpolymer kovalent verankerten, unvernetzten funktionellen Pfropfcopolymerketten besteht (die UV-Belichtung erfolgt vorzugsweise selektiv, so daß nur der Photoinitiator angeregt wird),
- 10 iii) Extraktion von nicht umgesetztem Monomer und Photoinitiator sowie von löslichen Homo- oder Copolymeren bzw. Photoinitiatorfolgeprodukten.

15 Abbildung 1 stellt schematisch das Herstellungsverfahren für den kontinuierlichen planaren Festphasenträger dar.

Auch eine sequentielle Aktivierung/Initiierung der Pfropfcopolymerisation ist möglich, indem zunächst die Belichtung der nach i) mit Photoinitiator beschichteten Trägermatrix in Gegenwart von Sauerstoff oder mit nachträglicher Exposition in Sauerstoff unter Bildung von
20 Trägerpolymer-Peroxiden erfolgt und danach die Reaktion mit dem Monomer thermisch initiiert wird. Auch andere heterogen chemisch initiierte Reaktionen zur Initiierung einer Pfropfcopolymerisation sind anwendbar.

Als Photoinitiator eignen sich besonders Benzophenon und strukturell verwandte Ketonderivate. Die Beschichtung mit dem Photoinitiator in Stufe i) kann aus einer Lösung in einem Nichtlösungsmittel für das Trägerpolymer durch Dip-Coating oder Imprägnieren vorgenommen werden; sie kann aber gegebenenfalls auch ohne zusätzlichen Verfahrensschritt direkt vor der in Stufe ii) beschriebenen Pfropfcopolymerisation erfolgen, indem der Photoinitiator aus einer Mischung aus Initiator, Monomer bzw. Monomergemisch und ggf. Lösungsmittel an der
30 Trägersoberfläche adsorbiert wird.

Den verwendeten Monomeren ist ein struktureller Aufbau gemeinsam, der in modularer Weise nach einem einheitlichen Reaktionsmechanismus (heterogene Pfropfcopolymerisation) zu einer Vielzahl von Oberflächenfunktionalitäten führen kann:

35

Reaktivgruppe – Spacergruppe – polymerisationsfähige Gruppe

Vorzugsweise werden funktionelle Acrylate, Methacrylate, Acrylamide oder Methacrylamide eingesetzt, aber auch andere funktionelle Vinylmonomere u.v.a.m. sind prinzipiell geeignet.
40 Beispiele für Reaktivgruppen als Anker für die Festphasensynthese sind Hydroxyl- oder Aminogruppen. Durch funktionelle Monomere eingeführte Carboxyl- oder Epoxygruppen können auch sehr leicht (z.B. nach "Umfunktionalisierung" zu Aminogruppen) dafür genutzt werden. Als Spacergruppen sind Oligo- oder Polyethylenglykolketten besonders bevorzugt, da sie in vielen verschiedenen Lösungsmitteln ähnlich gut solvatisiert werden, eine gute
45 Beweglichkeit garantieren und auch die Biokompatibilität verbessern. Spaltbare Linkerstrukturen können z.B. Ester (in Acrylaten) oder Amide (in Acrylamiden) sein, wobei letztere eine wesentlich bessere Hydrolysestabilität aufweisen und für Festphasensynthesen unter harschen organisch-chemischen Bedingungen zu bevorzugen sind. Hydroxy- oder Amino(polyethylenglycol)methacrylate bzw. -methacrylamide sind Beispiele für Monomere,
50 nach deren Pfropfcopolymerisation Träger resultieren, die direkt mit besonderen Vorzügen für die SPOT-Synthese verwendet werden können. Mit Pfropfpolyacrylsäure funktionalisierte Träger lassen sich einfach mit Diamino-oligoethylenglycolen zu hydrolysestabilen Amino-Trägern "umfunktionalisieren".

Zur Präparation von Pfropfketten aus Copolymerisaten können o.g. funktionelle Monomere in Mischung mit anderen funktionellen, aber auch mit inerten Monomeren eingesetzt werden. Letzte können zur "Verdünnung" reaktiver Gruppen am/im Festphasenträger oder zur Einstellung der Hydrophilie/phobie bzw. Ladung (u.U. auch wesentlich für die Assaykompatibilität) genutzt werden.

Bei vorgegebener Trägermatrix, mit entsprechender homogener oder poröser Struktur und damit geringer oder größerer spezifischer Oberfläche, lassen sich über die Pfropfcopolymerisationsbedingungen (Photoinitiatorbeschichtung, Monomerkonzentration, Belichtungsdauer) der Funktionalisierungsgrad und damit die Beladung mit Reaktivgruppen pro Fläche in weiten Bereichen (bis zu $10 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) einstellen. Durch die Pfropfcopolymerketten wird in jedem Fall eine Kapazitätsvergrößerung verglichen mit einer polymeranalog funktionalisierten glatten Trägeroberfläche erzielt. Bei Wahl geeigneter Bedingungen (Lichtabsorption von Photoinitiator und Trägermatrix) sind gleichmäßige Funktionalisierungen dicker poröser Schichten (mit BP bei PP-Membranen bis zu $200 \mu\text{m}$) möglich.

Die vorzugsweise angewandte Photofunktionalisierung gestattet in einem schnellen und effektiven Verfahren die reproduzierbare und gleichmäßige Funktionalisierung großer kontinuierlicher Festphasenträgerflächen.

Synthesen auf den neuen kontinuierlichen polymeren Festphasenträgern

Durch das gewählte Herstellungsverfahren wird es möglich, auf einer festen Trägermatrix primäre Reaktivgruppen, vorzugsweise Amino- bzw. Hydroxylgruppen, in großer Anzahl ($>1 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) bei guter Zugänglichkeit zu generieren. Interessanterweise bleibt diese Zugänglichkeit auch über eine größere Zahl von Synthesesyklen (10% Beladungsabfall nach ca. 10 Synthesesyklen) nahezu konstant. Die Ursache dafür ist in einer großen spezifischen Oberfläche in Kombination mit geeigneter Porenstruktur der Trägermatrix des Trägers (poröse Membran) sowie einer sehr guten Beweglichkeit der Reaktivgruppen, bedingt durch solvatisierte Pfropfcopolymerketten und weitere Spacergruppen, zu finden. Desweiteren führt die optimale Benetzung der äußeren Trägeroberfläche zu definierten Spots mit minimalen Tiefenfiltrationseffekten und radialen Konzentrationsgradienten. Wegen der dadurch konstanten Reagenzienüberschüsse an jedem Ort der Benetzung kann eine nahezu konstante Produktqualität gewährleistet werden. Aufgrund der Homogenität des Festphasenträgers (identische Anzahl von gleich zugänglichen Funktionalitäten über die gesamte Fläche) können gleiche Produktmengen pro Spot generiert werden. Darüberhinaus führt die verringerte Hydrophobie der modifizierten Festphasenträger im Vergleich zur Trägermatrix in Verbindung mit der durch die Spacerstrukturen induzierten Beweglichkeit der gebundenen Substanzen zu einer guten Assaykompatibilität.

Die polymeren Festphasenträger zeichnen sich weiterhin durch eine hohe chemische Stabilität, das heißt Resistenz gegenüber starken Säuren, Laugen, Lösungsmitteln sowie oxidierenden und reduzierenden Reagenzien aus. Desweiteren besitzen die neuen polymeren Festphasenträger eine hohe Beständigkeit gegenüber physikalischen Einflüssen wie Temperatur, Ultraschall- und Mikrowellenbehandlung, was dazu führt, daß die kontinuierlichen Oberflächen auch nach mehreren Reaktionszyklen keine oder nur vernachlässigbare Quellung zeigen. Diese Eigenschaften lassen eine wiederholte, örtlich adressierte Pipettierung kleinster Volumina (10 nl) und im Gegensatz zur Zellulose eine weitgehende Variation der chemischen Reaktionsbedingungen zu.

Die neuen kontinuierlichen polymeren Festphasenträger können mit einer Vielzahl von Linkerkonstrukten zur Aufnahme von weiteren Molekülen vorbereitet werden. So sind neben säuresensitiven Linkern (z. B. Rink-Linker), UV-aktivierbare Photolinker (z. B. 4-(Methoxy-4-(2-Fmoc-amino-ethyl)-5-nitrophenoxylbutansäure) auch basenlabile Linker (z. B. HMBA-

Linker) oder mit wässrigen Puffersystemen spaltbare Linkerkonstrukte (z. B. Imidazolinkers) einsetzbar. Diese Linker sind auf dem kontinuierlichen Festphasenträger durch örtlich definierte Applikation von Spots auch parallel anwendbar und können z.B. zur Synthese von multipel oder graduell abspaltbaren Produkten genutzt werden.

- 5 Obwohl auch peptidische Substanzen mit gleicher oder besserer Qualität als bei der herkömmlich verwendeten Zellulose hergestellt werden können, ergeben sich aus den oben genannten Eigenschaften der neuen Festphasenträger vor allem vielfältige Möglichkeiten für die Synthese von organisch-kombinatorisch hergestellten Substanzbibliotheken. Da die neuen
- 10 Festphasenträger erfindungsgemäß eine hohe chemische und physikalische Stabilität besitzen, liegen ihre entscheidenden Vorteile besonders in der kombinatorischen Synthese von Bibliotheken aus nichtnatürlichen Oligomeren (z. B. Peptiden, Oligocarbamaten, Oligoharnstoffen, Azatiden, Ketiden, Peptid-Sulfonamiden, vinylogenen Sulfonylpeptiden) sowie kleinen synthetischen Molekülen (z. B. Benzodiazepinen, Triazinen, Triazolen, Hydantoinen,
- 15 Cubanen, Xanthenen, Pyrollidinen, β -Laktamen, Thiazolidonen). Weiterhin liegt ein Anwendungsschwerpunkt in der Parallelsynthese von Chimären (Konjugate) aus unterschiedlichen synthetischen (natürlich oder unnatürlichen) Oligomeren bzw. kleinen synthetischen Molekülen mit Naturstoffen wie z. B. Steroiden oder Zuckermolekülen.
- 20 Vorteilhaft ist die Verwendung der kontinuierlichen Festphasenträger, welche nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt worden, für die parallele und kombinatorische Synthese von trägergebundenen oder freien Verbindungen, die durch SPOT-Synthese von aktivierten Synthesebausteinen an verschiedenen Reaktionsorten auf dem kontinuierlichen Festphasenträger synthetisiert werden.
- 25 Bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Verwendung der kontinuierlichen Festphasenträger für die parallele und kombinatorische Synthese von Proteinen.
- 30 Mehr bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Verwendung der kontinuierlichen Festphasenträger für die Festphasensynthese, vorzugsweise SPOT-Synthese, auch als Array von identisch oder unterschiedlich funktionalisierten Trägern bzw. als Stapel von identisch oder unterschiedlich funktionalisierten Trägern für die Synthese von multipel oder graduell abspaltbaren Verbindungen, wobei durch Split (Single Sheets) & Combine (Stapel) Techniken mit ganzen Trägern auch eine quasi dreidimensionale Kombinatorik möglich wird.
- 35 Noch mehr bevorzugt ist die erfindungsgemäße Verwendung der kontinuierlichen Festphasenträger für die Identifizierung von Molekülen (Liganden) an synthetisierten Verbindungen, umfassend die folgenden Schritte:
Inkubation mit dem Liganden, Entfernen von überschüssigen Liganden durch Waschen,
- 40 Detektion gebundener Liganden durch geeignete Verfahren wie: i) immunologische Nachweise, ii) Nachweis gebundener radioaktiv markierter Liganden, iii) Fluoreszenz- oder Chemolumineszenz-Nachweise, iv) biosensorische Nachweise.
- 45 Am meisten bevorzugt ist die erfindungsgemäße Verwendung der kontinuierlichen Festphasenträger zur Untersuchung enzymatischer Aktivitäten an synthetisierten Verbindungen, umfassend die folgenden Schritte:
i.) Inkubation mit dem Enzym, ii.) Detektion enzymatischer Aktivität.
- 50 Die Erfindung wird im folgenden anhand von Beispielen näher beschrieben, welche die Synthese der neuen kontinuierlichen polymeren Festphasenträger, deren Anwendung in der SPOT-Synthese von Peptiden und anderen organisch-chemischen Molekülen sowie von Substanzbibliotheken aus Peptiden und anderen organisch-chemischen Molekülen, und die Anwendung in Analyse- und Screeningsystemen detaillierter erläutern. Selbstverständlich ist die Erfindung nicht auf diese konkreten Beispiele begrenzt.

Definitionen

- Festphasensynthese:**
5 kovalente Verknüpfung von Molekülen mit einem unlöslichem polymeren Träger und nachfolgende Reaktionen an den trägergebundenen Substanzen, wobei durch einfache Wasch- und Filtrieroperationen überschüssige Reagenzien einsetzbar und abtrennbar werden und das Zielprodukt bis zur Abspaltung am polymeren Träger gebunden bleibt
- 10 **Funktionelle Monomere:**
Moleküle, die eine polymerisationsfähige Gruppe, eine Spacergruppe und eine Reaktivgruppe enthalten und unter dem Einfluß eines Polymerisationsinitiators lineare und/oder verzweigte Polymerketten bilden können
- 15 **Kontinuierlicher Festphasenträger:**
flächiges Material aus einer Trägermatrix (s.u.) mit daran kovalent verankerten Pfropfcopolymerketten (s.u.)
- Ligand**
20 Molekül, das an die auf dem kontinuierlichen Festphasenträger synthetisierten Verbindungen bindet und/oder sie chemisch umsetzt und das ein Protein, Enzym, Kohlenhydrat oder Glykoprotein, Lipide oder Lipoprotein, eine Nukleinsäure oder eine niedermolekulare Verbindung sein kann
- 25 **Linker:**
molekulares spaltbares Anker-molekül, welches die Abspaltung der synthetischen Zielprodukte vom Festphasenträger erlaubt
- Pfropfcopolymerketten:**
30 lineare und/oder verzweigte Molekülketten, aufgebaut aus funktionellen Monomeren (s.u.)
- Photoinitiator:**
erzeugt nach Beschichten der Oberfläche eines Trägerpolymers und Anregung mittels UV-Strahlung durch Wasserstoffabstraktion vom Trägerpolymer Radikale, die mit einem
35 funktionellen Monomer reagieren können, z.B. ein Benzophenonderivat oder Keton
- Polymerisationsfähige Gruppe:**
reaktionsfähige Mehrfachbindung in funktionellen Monomeren, z.B. eine Acrylat-, Vinyl-, oder Allylgruppe
40
- Radikale:**
elektrisch neutrale Moleküle, die ein magnetisches Moment besitzen, eine bevorzugte Reaktivität ist die Addition an Verbindungen, die reaktionsfähige Mehrfachbindungen (polymerisationsfähige Gruppen) enthalten
45
- Reaktivgruppe:**
reaktionsfähige chemische Gruppe (Funktionalität) für kovalente Kupplungsreaktionen mit anderen Verbindungen, z.B. eine Hydroxylgruppe, Carboxylgruppe, Aminogruppe, Mercaptogruppe oder eine Halogengruppe
50
- Spacergruppe:**
molekularer Abstandhalter zwischen polymerisationsfähiger Gruppe und Reaktivgruppe in einem funktionellen Monomer, z.B. ein Oligo- oder Polyethylenglykol oder eine Bindung

SPOT

entsteht durch das Pipettieren von Reagentien auf zusammenhängende kontinuierliche Oberflächen, wobei das pipettierte Volumen die Größe des SPOTs und die Zahl der möglichen SPOTs pro Fläche definiert

5

Spotten

das Pipettieren von Reagentien auf zusammenhängende kontinuierliche Oberflächen

SPOT-Synthese:

- 10 Festphasensynthesekonzept bei dem durch Pipettierung von kleinen Reagenströpfchen auf ein vordefiniertes Array von Reaktionsorten auf einer zusammenhängenden kontinuierlichen Festphasenträger, die als polymerer Festphasenträger fungiert, SPOTs definiert werden; diese SPOTs stellen Mikroreaktoren dar, in denen Festphasensynthesen ablaufen können, wenn Lösungsmittel mit geringem Dampfdruck verwendet werden

15

Trägermatrix:

chemisch und morphologisch stabiles, flächiges Material, das aus polyolefinischen Polymeren(Trägerpolymer) wie Polyethylen, Polystyren, Polyvinylidenfluorid, Polytetrafluorethylen, bevorzugt aber Polypropylen besteht

20

UV-Anregung:

überführt den Photoinitiator in einen angeregten Zustand, ohne das Trägerpolymer anzuregen (zu degradieren)

- 25 Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Synthese von kontinuierlichen polymeren Festphasenträgern - Hydroxy-PEG-Ester-PP-Membranen mit unterschiedlichen Spacerlängen - unter Laborbedingungen

- 30 Eine PP-Membran (Accurel 2E, Akzo; nom. Porendurchmesser $d_p = 0.2 \mu\text{m}$, Schichtdicke $150 \mu\text{m}$; $d = 80 \text{ mm}$) wird unter Schütteln für 2 h mit einer 100 mM Lösung von Benzophenon (BP) in Methanol equilibriert. Die Membran wird aus der Lösung entnommen und die Oberfläche schnell an der Luft getrocknet, ohne daß das Innere der Poren entnetzt wird. Danach wird die Membran in einer Petrischale ($d = 90 \text{ mm}$) auf ein mit einem Teil der Monomerlösung (ca. 5 ml)
- 35 getränktes Filterpapier gelegt, mit einem Glasring ($d = 80 \text{ mm}$) fixiert und sofort mit dem Rest der Polymerisationslösung überschichtet (insgesamt 20 ml 50 g/l PEGMA 306 bzw. 78.5 g/l PEGMA 526, jeweils in mit BP gesättigtem Wasser; die Monomere -PEG-methacrylate, wobei die Zahl das mittlere Molekulargewicht beschreibt- sind Produkte der Polysciences Europe GmbH, Eppelheim). Die Petrischale wird in einem Reaktor plaziert, der danach mit einem UV-
- 40 Filterglas-Deckel (Cut-off 310 nm) verschlossen und für mindestens 30 min mit Stickstoff gespült wird. Anschließend erfolgt - weiterhin unter Stickstoffspülung - für 30 min die UV-Belichtung (HBO 350 DeepUV; Hamamatsu, in einer Belichtungsapparatur von Oriel, 3 mW/cm²). Nach weiteren 15 min. unter Stickstoff wird die Membran entnommen und anschließend vollständig mit Wasser, Methanol und Aceton extrahiert. Die Bestimmung des
- 45 Modifizierungsgrades (DG) der Membran erfolgt gravimetrisch: DG (PEGMA 306) = $1.12 \text{ mg/cm}^2 = 3.5 \mu\text{mol/cm}^2$; DG (PEGMA 526) = $1.37 \text{ mg/cm}^2 = 2.6 \mu\text{mol/cm}^2$. Eine weitere Charakterisierung erfolgt durch FTIR-ATR-Spektroskopie, REM sowie Messung der Membranpermeabilität.

- 50 Beispiel 2: Synthese von kontinuierlichen polymeren Festphasenträgern - Carboxyl-PP- bzw. Carboxyl-Polyethylen(PE)-Membranen - unter Laborbedingungen

Eine PP- (Accurel 2E, Akzo; $d_p = 0.2 \mu\text{m}$, Schichtdicke $150 \mu\text{m}$) bzw. PE-Membran (celgard 2500, Hoechst-Celanese $d_p = 0.2 \mu\text{m}$, Schichtdicke $25 \mu\text{m}$) mit einem Durchmesser von $d = 80$

- mm wird unter Schütteln für 2 h mit einer 100 mM Lösung von BP in Methanol equilibriert. Die Membran wird aus der Lösung entnommen und die Oberfläche schnell an der Luft getrocknet, ohne daß das Innere der Poren entnetzt wird. Danach wird die Membran in einer Petrischale (d = 90 mm) auf ein mit einem Teil der Monomerlösung (ca. 5 ml) getränktes Filterpapier gelegt, mit einem Glasring (d = 80 mm) fixiert und sofort mit dem Rest der Monomerlösung überschichtet (insgesamt 20 ml 10 g/l Acrylsäure, AA, in mit BP gesättigtem Wasser). Die Petrischale wird in einem Reaktor platziert, der danach mit einem UV-Filterglas-Deckel (Cut-off 310 nm) verschlossen und für mindestens 30 min mit Stickstoff gespült wird. Anschließend erfolgt - weiterhin unter Stickstoffspülung - für 30 min (PP) bzw. 15 min (PE) die UV-Belichtung (HBO 350 DeepUV; 3 mW/cm²). Nach weiteren 15 min. unter Stickstoff wird die Membran entnommen und anschließend vollständig mit Wasser und Aceton extrahiert. Die Bestimmung des Modifizierungsgrades (DG) der Membran erfolgt gravimetrisch:
- DG(PP) = 220 µg/cm² = 3.1 µmol/cm²;
 DG(PE) = 245 µg/cm² = 3.4 µmol/cm².
- Eine weitere Charakterisierung erfolgt durch FTIR-ATR-Spektroskopie, REM, Farbstoffbindung (Toluidinblau) sowie Messung der Membranpermeabilität.

Beispiel 3: Synthese von kontinuierlichen polymeren Festphasenträgern - Hydroxy-Amid-PP-Membranen - unter Laborbedingungen

- Eine PP-Membran (Accurel 2E, Akzo; d_p = 0.2 µm) mit einem Durchmesser von d = 80 mm wird unter Schütteln für 2 h mit einer 100 mM Lösung von BP in Aceton equilibriert. Die Membran wird aus der Lösung entnommen und die Oberfläche schnell an der Luft getrocknet, ohne daß das Innere der Poren entnetzt wird. Danach wird die Membran in einer Petrischale (d = 90 mm) auf ein mit einem Teil der Polymerisations-lösung (ca. 5 ml) getränktes Filterpapier gelegt, mit einem Glasring (d = 80 mm) fixiert und sofort mit dem Rest der Polymerisationslösung überschichtet (insgesamt 20 ml 40 g/l 2-Hydroxypropylmethacrylamid, 2HPMAm, in mit BP gesättigtem Wasser; Monomer von Polysciences). Die Petrischale wird in einem Reaktor platziert, der danach mit einem UV-Filterglas-Deckel (Cut-off 310 nm) verschlossen und für mindestens 30 min mit Stickstoff gespült wird. Anschließend erfolgt - weiterhin unter Stickstoffspülung - für 45 min die UV-Belichtung (HBO 350 DeepUV; 3 mW/cm²). Nach weiteren 15 min. unter Stickstoff wird die Membran entnommen und anschließend vollständig mit Wasser und Aceton extrahiert. Die Bestimmung des Modifizierungsgrades (DG) der Membran erfolgt gravimetrisch: DG = 355 µg/cm² = 2.5 µmol/cm².
- Eine weitere Charakterisierung erfolgt durch FTIR-ATR-Spektroskopie, REM, Farbstoffbindung (Toluidinblau) sowie Messung der Membranpermeabilität.

- Beispiel 4: Synthese von kontinuierlichen polymeren Festphasenträgern - Benzylchlorid-PP-Membranen - unter Laborbedingungen

- Eine PP-Membran (AN06, Millipore Corp; d_p = 0.6 µm) mit einem Durchmesser von d = 80 mm wird gewogen und anschließend unter Schütteln 2 h mit einer Lösung von BP in Aceton (150 mM) equilibriert. Die BP beschichtete, noch feuchte Membran wird in einer Petrischale (d = 90 mm) auf ein mit einem Teil der Polymerisationslösung getränktes Filterpapier gelegt, mit einem Glasring (d = 80 mm) fixiert und sofort mit dem Rest der Polymerisationslösung überschichtet (insgesamt 20 ml 20 g/l Vinylbenzylchlorid VBC, in mit BP gesättigtem Wasser unter Zugabe von 7 g/l Emulgator Bis[2-ethylhexyl]sulfosuccinat-Natriumsalz bei 10000 upm für 30 Sekunden mit einem Thurrax emulgiert).
- Die Petrischale wird für 30 Minuten geschüttelt und mit einer Glasplatte (Tief-UV-Filter, Cut-off 310 nm) abgedeckt. Die Belichtung erfolgt bei Halblast an einem UV-Trockner (Beltron-GmbH; 1 min UV-Belichtung pro Passage durch die Belichtungszone). Anschließend wird die Membran 1 h in einem Soxhlet mit Methanol und 1 h bei 50°C in Wasser extrahiert. Danach wird die modifizierte Membran getrocknet und gravimetrisch der Modifizierungsgrad (DG) bestimmt.

DG = $1,5 \text{ mg/cm}^2 = 9,8 \text{ } \mu\text{mol/cm}^2$. Eine weitere Charakterisierung erfolgt durch FTIR-ATR-Spektroskopie, REM, Farbstoffbindung (Toluidinblau) sowie Messung der Membranpermeabilität.

- 5 Beispiel 5: Synthese von - kontinuierlichen polymeren Festphasenträgern Hydroxy-PEG-Ester-PP-Membranen - unter Technologiebedingungen

10 Eine PP-Membran (Accurel 2E, Akzo; $d_p = 0,2 \text{ } \mu\text{m}$, bzw. AN06, Millipore Corp; $d_p = 0,6 \text{ } \mu\text{m}$) mit einer Fläche von $18 \text{ cm} \times 26 \text{ cm}$ wird gewogen und anschließend in Lösung von BP in Methanol oder Aceton für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die BP beschichtete, noch feuchte Membran wird in eine Schale mit 300 ml Monomerlösung (PEGMA 526 in mit BP gesättigtem Wasser) auf Filterpapier gelegt und getränkt. Die Schale wird mit einer Glasplatte (Tief-UV-Filter, Cut-off 310nm) abgedeckt. Die Belichtung erfolgt bei Halblast an einem UV-Trockner (Beltron GmbH; 1 min. UV-Belichtung pro Passage durch die Belichtungszone).

15 Anschließend wird die Membran 1 h in einem Soxhlet mit Methanol und 1 h bei $50 \text{ } ^\circ\text{C}$ in Wasser extrahiert. Danach wird die modifizierte Membran getrocknet und gravimetrisch der Modifizierungsgrad bestimmt. Die Charakterisierung der Membran erfolgt analog wie in Beispiel 1 beschrieben.

20 Mit der Wahl der Synthesebedingungen (Photoiniatorbeschichtung, Monomerkonzentration, Belichtungsdauer) kann der Modifizierungsgrad variiert und für unterschiedliche Trägermembrantypen eingestellt werden (Beispiele s. Tab. 1).

Beispiel 6: Synthese von kontinuierlichen polymeren Festphasenträgern - Carboxyl-PP-Membranen - unter Technologiebedingungen

25 Eine PP-Membran (Accurel 2E, Akzo; $d_p = 0,2 \text{ } \mu\text{m}$, bzw. AN06, Millipore Corp; $d_p = 0,6 \text{ } \mu\text{m}$) mit einer Fläche von $18 \text{ cm} \times 26 \text{ cm}$ wird gewogen und anschließend in Lösung von BP in Methanol oder Aceton für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die BP beschichtete, noch feuchte Membran wird in eine Schale mit 300 ml Monomerlösung (AA in mit BP-gesättigtem Wasser) auf Filterpapier gelegt und getränkt. Die Schale wird mit einer Glasplatte (Tief-UV-Filter, Cut-off 310nm) abgedeckt. Die Belichtung erfolgt bei Halblast an einem UV-Trockner (Beltron GmbH; 1 min. UV-Belichtung pro Passage durch die Belichtungszone). Anschließend wird die Membran 1 h in einem Soxhlet mit Methanol und 1 bei $50 \text{ } ^\circ\text{C}$ in Wasser extrahiert. Danach wird die modifizierte Membran getrocknet und gravimetrisch der Modifizierungsgrad bestimmt. Die Charakterisierung der Membran erfolgt analog wie in Beispiel 2 beschrieben.

35 Mit der Wahl der Synthesebedingungen (Photoiniatorbeschichtung, Monomer-konzentration, Belichtungsdauer) kann der Modifizierungsgrad variiert und für unterschiedliche Trägermembrantypen eingestellt werden (Beispiele s. Tab. 1).

- 40 Tabelle 1: Technologie-Synthesebedingungen für ausgewählte Hydroxy-PEG-Ester- und Carboxyl-PP-Membranen (Membran: 1 $0,2 \text{ } \mu\text{m}$, Accurel 2E; 2 $0,6 \text{ } \mu\text{m}$, AN06; UV-Belichtung unter Halblast mit UV-Trockner, Beltron GmbH)

| Membran | Photoiniator- beschichtung | Mono- mer | Monomer (g/l) | Belichtung (min) | DG (mg/cm^2) | DG ($\mu\text{mol/cm}^2$) |
|---------|-------------------------------|--------------|------------------|---------------------|----------------------------|--------------------------------|
| 1 | 150mM BP/Aceton | PEGMA 526 | 78.5 | 15 | 1.28 | 2.4 |
| 1 | 150mM BP/Aceton | AA | 23.3 | 10 | 0.48 | 6.8 |
| 1 | 150mM BP/Aceton | AA | 50.0 | 10 | 0.64 | 9.0 |
| 2 | 100mM BP/Aceton | PEGMA 526 | 78.5 | 10 | 0.19 | 0.36 |
| 2 | 100mM | PEGMA | 100.0 | 10 | 0.34 | 0.65 |

| | | | | | | |
|---|--------------------|-----|------|------|------|-----|
| | BP/Aceton | 526 | | | | |
| 2 | 100mM BP/Aceton | AA | 50.0 | 10 | 0.13 | 1.8 |
| 2 | 150mM BP/Aceton | AA | 50.0 | 5/5* | 0.17 | 2.4 |

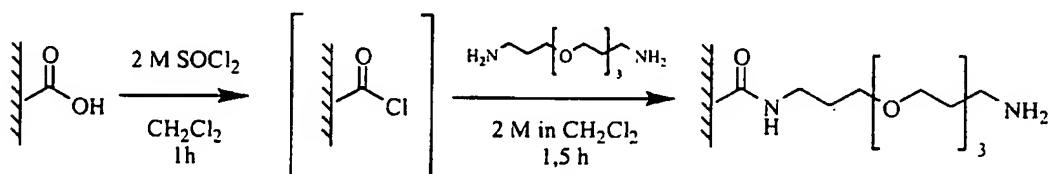
* Membran beidseitig belichtet

Beispiel 7: Synthese von kontinuierlichen polymeren Festphasenträgern - chemische Derivatisierung einer Carboxyl-PP-Membran (Aminofunktionalisierung)

5

Ein Membranstück (0.2 μm ; aus Beispiel 6) der Größe 18 cm x 26 cm wurde in einer Instrumentenschale 1 h mit 80 ml einer 2 M Lösung von Thionylchlorid in DCM behandelt. Die Lösung wurde abdekantiert und die noch feuchte Membran sofort mit 100 ml einer 30proz. Lösung von 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin in DCM (v/v) versetzt. Nach 90 min. wurde abdekantiert und die Membran gewaschen (1 x DCM, 5 x Methanol, je 5 min.) und getrocknet (Schema I).

10



Schema I.

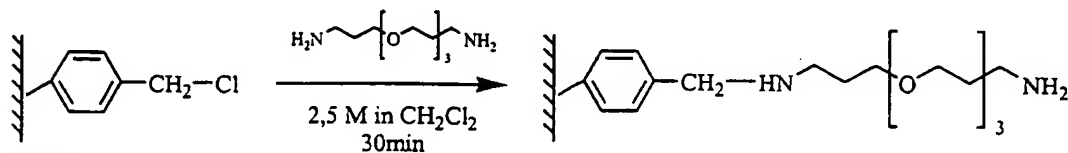
15 Beispiel 8: Synthese von kontinuierlichen polymeren Festphasenträgern - chemische Derivatisierung einer Benzylchlorid-PP-Membran (Aminofunktionalisierung)

Ein Membranstück (0.2 μm ; aus Beispiel 4) der Größe 5 cm x 3 cm wurde in einer Instrumentenschale 30 min mit einer 2,5 M Lösung von 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin in DCM (v/v) bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurde die Lösung abdekantiert und die Membran gewaschen (1x DCM, 3x DMF, 3x MeOH, 2x DCM, je 5 min) und getrocknet (Schema II). Beladung 102 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$.

20

Ein Membranstück (0.2 μm ; aus Beispiel 4) der Größe 5 cm x 3 cm wurde in einer Instrumentenschale 30 min mit einer 2,5 M Lösung von 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin in DCM (v/v) bei 80°C behandelt. Anschließend wurde die Lösung abdekantiert und die Membran gewaschen (1x DCM, 3x DMF, 3x MeOH, 2x DCM, je 5 min) und getrocknet (Schema II). Beladung 152 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$.

25



30 Schema II.

Beispiel 9: Testung unterschiedlicher Linkersysteme an Hydroxy-PEG-Ester PP - Membranen

35 Eine Hydroxy-PEG-Ester PP-Membran (0.2 μm , aus Beispiel 1) wurde durch sukzessives Spotten von 1 μl einer 0.6 M NMI-Lösung in NMP und 1 μl einer 0.6 M Lösung von Fmoc- β Ala-F in NMP umfunktionalisiert (Amino: Reaktionszeit 2x30 min). Nach vollständiger

Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (Baden der Membran in 20%-iger Piperidin/DMF, 2x15 min) und anschließender Wäsche mit DMF (2x), Methanol (2x) und DCM (2x) und Trocknung an der Luft wurden die folgenden aktivierten Linkermoleküle auf die freien, mit Bromphenolblau angefärbten, Aminofunktionen gespottet:

- 5 A) 2 µl 0.6 M Rink-Linker (p-[(R,S)-µ[1-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxyformamido]2,4-dimethoxybenzyl]-phenoxyessigsäure) in NMP (5 min voraktiviert mit 1 Eq. TBTU und 2 Eq. DIEA)
- 10 B) 2 µl 0.6 M Imidazolinkers in NMP (5 min voraktiviert mit 1 Eq. TBTU und 1 Eq. DIEA)
- C) 2 µl 0.6 M Aminoethyl-Photolinker 4-[2-Methoxy-4-(1-Fmoc-aminoethyl)-5-nitrophenoxy]-butansäure) in NMP (5 min voraktiviert mit 1 Eq. TBTU und 2 Eq. DIEA)
- D) 2 µl 0.6 M Hydroxyethyl-Photolinker 4-[2-Methoxy-4-(hydroxyethyl)-5-nitrophenoxy]-butansäure) in NMP (5 min voraktiviert mit 1 Eq. TBTU und 1 Eq. DIEA)

15 Die Reaktionszeit betrug in allen Fällen 2 x 30 min. Nach Spaltung der Fmoc-Gruppen wurde das Modellpeptid (Ac-Leu-Lys-Tyr-βAla) mittels Fmoc-Aminosäure-OPfp-Estern (2 µl, 0.3 M in NMP, 2x15 min) unter Spotsynthesebedingungen aufgebaut. Neben der Synthese an Linkersystemen wurde auch eine Synthese direkt auf der βAla-modifizierten Membran durchgeführt. Im Anschluß an das Spotten der 1. Aminosäure wurde die Membran acetyliert, um die Spotgröße zu definieren (Ac₂O, DIEA, DMF; 1:2:7; 30 min) Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Gruppe wurden die Peptide erneut acetyliert. Die Seitenkettenschutzgruppen wurden im Fall des Imidazolinkers, des Photolinkers und der direkten Synthese ohne Linker mittels 5% H₂O in TFA (2 h) deblockiert. Anschließend wurden die Peptide wie folgt abgespalten:

25 Rink-Linker: 2 h 95% TFA; 5% H₂O
Imidazolinkers: 1 h Phosphatpuffer pH: 7.4
Photolinker (C+D): Abspaltung im trockenen Zustand mittels UV-Bestrahlung: 2 h, 365 nm

30 Nach Eindampfen der TFA und Aufnahme der adhäsiv gebundenen Peptide in 50% ACN/ H₂O wurde die Qualität der Produkte mittels HPLC und massenpektrometrischer Analyse kontrolliert. Alle auf den neuen Festphasenträgern zum Einsatz gekommenen Linker machten die Isolierung der Produkte mit hoher HPLC-Reinheit (>85%) möglich.

35 Beispiel 10: Vergleichende Synthese von Peptiden auf herkömmlich verwendeter Zellulose und Hydroxy-PEG-Ester PP-Membranen

40 Die Zellulose- und die Hydroxy-PEG-Ester-PP-Membranen (0.2 µm, aus Beispiel 1) wurden mit Fmoc-βAla-F/NMI in NMP acyliert und nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe (20% Piperidin/DMF, 20 min) mit dem photolysierbaren Linker 4-2[-Methoxy-4-(1-Fmoc-aminoethyl)-5-nitrophenoxy]-butansäure) modifiziert. Die folgenden Peptide unterschiedlicher Kettenlänge wurden mittels Fmoc-geschützten Aminosäure-Pentafluorphenylestern (2 µl einer 0.3 M Lösung in NMP, Doppelkupplung 2 x 15 min) unter identischen Bedingungen schrittweise aufgebaut:

45 Ac-Val-Val-Ser-His-Phe-Asn-Asp-Gly-βAla
Ac-Tyr-Ala-Lys-Arg-Cys-Pro-Val-His-Thr-Met-βAla
Ac-Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr-βAla

50 Die N-terminale Aminofunktion wurde acetyliert und die Seitenkettenschutzgruppen 2.5 h mittels 5% H₂O, 5% Phenol, 2.5% TIPS in TFA abgespalten. Nach ausgiebiger Wäsche mit DCM und Methanol wurden die Membranen getrocknet und die Peptide durch Bestrahlung mit UV-Licht (2 h, 365 nm) von der Oberfläche gespalten. Die adhäsiv auf der Membran

gebundenen Verbindungen konnten nach dem Ausstanzen und Überführen in Mikrotiterplatten mittels Puffer abgelöst und der HPLC/MS-Analytik zugeführt werden.

- 5 In allen Fällen besitzen die an der Hydroxy-PEG-Ester-PP-Membran hergestellten Peptide eine höhere Produktreinheit als die an herkömmlicher Zellulose synthetisierten, wie durch die analytischen Profile des Tests zu belegen ist.

Beispiel 11: Synthese kleiner organischer Moleküle: 1,3,5-Triazin-Bibliothek

- 10 Auf eine aminderivatisierte Carboxyl-PP-Membran (siehe Beispiel 7) wurden 2.3 µl einer 0.5 M Lösung von p-[(R,S)-a-[1-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxyformamido]2,4-dimethoxybenzyl]-phenoxyessigsäure (Rink-Linker), TBTU (1 Eq.) und DIEA (2 Eq.; Voraktivierungszeit: 5 min) im Abstand von 0.8 bis 1 cm gespottet. Nach 15 min wurde das Spotten wiederholt. Nach weiteren 15 min wurde die Membran zweimal 5 min mit MeOH und zweimal 10 min mit DCM
15 gewaschen. Anschließend wurde die Spot-Prozedur wiederholt. Man erhielt nach Fmoc-Quantifizierung Beladungen von ca. 700 nmol/cm², was ca. > 90% der Funktionalitätsdichte der aminderivatisierten Polypropylen-Membran entsprach.

- 20 Die mit dem Rink-Linker derivatisierte Membran (100 cm²; 96 Spots) wurde zweimal für 25 min in 75 ml 25proz. Piperidin-Lösung in DMF gebadet und anschließend jeweils zweimal für 10 min mit je 50 ml DMF, MeOH und DCM gewaschen. Zur Acylierung der freien Aminofunktion wurde eine 0.6 M Lösung der Aminosäure mit einem Äquivalent TBTU und zwei Äquivalenten DIEA in DMF auf die Membran gespottet (2 µl pro Spot). Nach 15 min wurde die Prozedur wiederholt. Nach beendeter Reaktionszeit wurde die Membran jeweils zweimal 10 min mit je 50
25 ml DMF, MeOH und DCM gewaschen. Die Entschützung der Aminofunktion erfolgte erneut durch zweimaliges Baden der Membran für 25 min in 75 ml 25proz. Piperidin Lösung in DMF und anschließendes Waschen (je 2x, 10 min mit je 50 ml DMF, MeOH und DCM).

- 30 Die Aminosäure-derivatisierte Membran wurde dann mit einer 3 M Lösung von Cyanurchlorid mit 3% DABCO in DCM bei 4 °C übergossen und 15 min bei 4°C und 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Membran 3x mit 50 ml DCM, 2x mit ACN (50 ml) und 2x mit 50 ml DCM je 10 min gewaschen.

- 35 Zur Substitution der Chloratome am festphasengebundenen 1,3,5-Triazinderivat spottete man 2 µl einer 60%-igen Lösung von prim. oder sek. Aminen (NHR₂R₃) in NMP auf die vorderivatisierte Membran und ließ im geschlossenen Gefäß 25 min bei Raumtemperatur reagieren. Anschließend wurde die Membran dreimal mit je 75 ml DMF (20 min), zweimal mit je 75 ml MeOH (20 min) und dreimal mit je 75 ml DCM (15 min) gewaschen. Auf die luftgetrocknete Membran wurde in einer Glasschale das prim. oder sek. Amin zur Substitution
40 des noch verbleibenden Chloratoms gespottet (2 µl einer 80%-igen Lösung in NMP) und die Membran in einer Mikrowelle 3 min erhitzt. Die überschüssigen Amine wurden mit DMF (3x je 75 ml, 20 min), 0.1%-iger wässriger Essigsäure (75 ml, 20 min), MeOH (dreimal Essigsäure (75 ml, 20 min), MeOH (dreimal je 75 ml, 20 min) und DCM (dreimal je 75 ml, 20 min) von der Membran entfernt.

- 45 Die Abspaltung der Moleküle erfolgte nach Ausstanzen und Überführen in Mikrotiterplatten mittels 150 µl 90%-iger TFA/DCM pro Spot (35 min, 30°C). Nach Abblasen der TFA im Stickstoff-Strom wurden die Substanzen in entsprechenden Puffersystemen aufgenommen und analysiert.

- 50 Beispiel 12: Synthese kleiner organischer Moleküle: Peptoid (N-Benzyl-N-[butyl-(carbamoylmethylcarbamoyl-methyl)carbamoylmethyl-2-[piperidin-1-yl]-acetamid)

Eine aminderivatisierte Carboxyl-PP-Membran (siehe Beispiel 7; vgl. Beispiel 11) wurde mit 30 ml einer 0.3 M Lösung von Fmoc-Glycin in DMF behandelt (30 min), nachdem die Lösung mit 1 Eq. TBTU und 2 Eq. DIEA voraktiviert wurde. Nach dem Waschen der Membran und Schutzgruppenabspaltung (3 x DMF, je 5 min, 1 x 20% Piperidin/DMF, 20 min, 5 x DMF, je 5 min) wurde die Membran erneut mit 30 ml einer frisch angesetzten Lösung von voraktiviertem Fmoc-Glycin versetzt. Nach 30 min Reaktionszeit und Waschen der Membran mit DMF (3 x 5 min) wurden 4 Proben aus der Membran ausgestanzt (0.23 cm²), um den chemisch erreichten Belegungsgrad der Membran zu bestimmen. Dazu wurden die Proben einzeln mit genau 1.00 ml einer 20%-igen Lösung von Piperidin in DMF versetzt und die UV-Absorbtion bei 301 nm gemessen. Es wurde ein Belegungsgrad von 0.45 µmol/cm² erreicht (entspricht 10% der gravimetrisch bestimmten Beladung).

Die mit zwei Glycinspacern versehene Membran wurde dann wie in Beispiel 9 beschrieben mit Rink-Linkersystem modifiziert und nichtumgesetzte Aminofunktionen acetyliert (Ac₂O, DIEA, DCM; 1:2:7). Die nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, Wäsche und Trocknung freigesetzte Aminofunktion wurde durch Aufpipettieren von 0.2 µl einer 0.3 M Fmoc-Glycin-Pentafluorphenylester-Lösung in NMP (3 x 15 min) amidiert. Die Membran wurde wie oben beschrieben gewaschen und die Fmoc-Gruppe abgespalten.

Die Aminofunktion wurde dann durch Pipettierung von 0.2 µl einer 1 M Lösung von Bromessigsäure-2-4 Dinitrophenylester in NMP (3 x 15 min) acyliert. Nach Wäsche mittels DMF (3 x, 5 min) und Methanol (3 x, 5min) und anschließender Trocknung an der Luft wurde durch Spotten von 0.2 µl n-Butylamin (5 M in NMP, 3x 15min) das Brom nukleophil substituiert. Nach Wäsche (3 x 5 min DMF, 3 x 5 min Methanol) und Trocknung an der Luft wurden zwei weitere Syntheseyklen durchgeführt, die sich durch die Natur der verwendeten Amine unterschieden (Zyklus 2: n-Butylamin; Zyklus 4: Piperidin).

Die ausgestanzten Spots wurden wie in Beispiel 9 beschrieben mittels TFA gespalten und die Produkte isoliert und analysiert. Alle untersuchten Produkte zeigten die erwartete Identität bei einer HPLC-Reinheit von >70%.

Beispiel 13: Synthese von oligomeren Hybriden aus Peptiden und Peptoiden (Peptomere)

Auf eine aminderivatisierte Carboxyl-PP-Membran (siehe Beispiel 7) wurden 2.5 µl einer 0.6 M Lösung von 4-(Methoxy-4-(2-Fmoc-aminoethyl)-5-nitrophenoxyl)-butansäure (photo-labiler Amid-Linker), TBTU (1 Eq.) und DIEA (2 Eq.; Voraktivierzeit: 5 min) im Abstand von 1.0 bis 1.5 cm gespottet. Nach 15 min wurde das Spotten wiederholt. Nach weiteren 15 min wurde die Membran dreimal 5 min mit DMF, zweimal 5 min mit MeOH und zweimal 10 min mit DCM gewaschen. Anschließend wurde die SPOT-Prozedur wiederholt. Man erhielt nach Fmoc-Quantifizierung Beladungen von ca. 700 nmol/cm², was ca. 90% der Funktionalitätsdichte der aminderivatisierten Polypropylen-Membran entsprach.

Die mit dem photolabilen Amid-Linker nicht umgesetzten Aminofunktionen werden acetyliert (Ac₂O, DIEA, DCM; 1:2:7; 30 min) und anschließend dreimal 5 min in DMF gewaschen. Die Fmoc-Schutzgruppe des Linkers wird durch zweimaliges 25 min. Baden der Membran in 75 ml 25% Piperidin in DMF abgespalten. Anschließend wird die Membran jeweils zweimal 10 min mit je 50 ml DMF, MeOH und DCM gewaschen.

Zur Acylierung der freigesetzten Linker-Aminofunktionen werden Fmoc-Aminosäure-Pentafluorphenylester (0.3 M in NMP; Aminosäure-Spots) oder Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (1.0 M in NMP; Peptoid-Spots) auf die Membran gespottet (2.5 µl pro Spot). Diese Prozedur wird insgesamt dreimal für jeweils 15 min wiederholt. Nach beendeter Reaktionszeit wird die Membran jeweils zweimal 10 min mit je 50 ml DMF, MeOH und DCM gewaschen. Die Entschützung der Fmoc-Aminofunktionen der Aminosäure-Spots erfolgt durch

dreimaliges Spotten für 15 min mit 50%iger Piperidin/NMP- Lösung. Gleichzeitig erfolgt die Substitution der Brom-Funktionen der Peptoid-Spots durch Spotten von ein bis fünf molaren Lösungen primärer und sekundärer Amine in DMF, NMP, DMSO, Dimethylacetamid oder Wasser. Nach beendeter Reaktionszeit wird die Membran jeweils zweimal 10 min mit je 50 ml DMF, MeOH und DCM gewaschen.

Die Acylierung der primären Amin-Funktionen (Aminosäure-Spots) und sekundären Amin-Funktionen (Peptoid-Spots) erfolgt entweder durch Spotten (3 x 15 Minuten) von 0.3 M Lösungen von Fmoc-Aminosäure-Pentafluorpenylestern in NMP (Aminosäure-Spots), 0,3 M Fmoc-Aminosäure-Anhydride in NMP (Peptoid-Spots) oder einer 1,0 M Lösung Bromessigsäure-2,4-Dinitrophenylester in NMP (Aminosäure- und Peptoid-Spots). Nach beendeter Reaktionszeit wird die Membran jeweils zweimal 10 min mit je 50 ml DMF, MeOH und DCM gewaschen. Anschließend wird wie oben beschrieben die Synthese fortgesetzt.

Die Fmoc-Aminosäure-Anhydride werden aus den Fmoc-Aminosäuren generiert (0.6 M Fmoc-Aminosäure in NMP; Zusatz von 0.5 Eq. DIC; Voraktivierung: 30 min).

Nach Abschluß der Synthese werden die Seitenkettenschutzgruppen abgespalten (5% H₂O, 5% Phenol, 2.5% TIPS in TFA). Nach ausgiebiger Wäsche mit DCM und Methanol werden die Membranen getrocknet und die Peptide durch Bestrahlung mit UV-Licht (365 nm, 7 mW/cm², 90 min) von der Membran abgespalten.

Die adhäsiv gebundenen Verbindungen konnten nach dem Ausstanzen und Überführen in Mikrotiterplatten mittels Puffer abgelöst und der HPLC/MS-Analytik zugeführt werden. Die verschiedenen Peptomere zeigten vergleichbare hohe Produktqualitäten wobei der jeweils größte Peak der Zielmasse des gewünschten Produktes entsprach.

Beispiel 14: Untersuchungen zur Biokompatibilität: Antikörperbindungsstudie auf Polymermembranen

Die Epitope Ac-Leu-Pro-Asn-Met-Leu-Arg-Asp-Leu-Arg-Asp-Ala-Phe-Ser-Arg-Val-βAla (mAk CB/RS/13-Epitop); Ac-Ile-Phe-Ile-Asn-Tyr-Ile-Glu-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-βAla (mAk CB/RS/11-Epitop); Ac-Val-Val-Ser-His-Phe-Asn-Asp-βAla (mAk Tab2-Epitop) und die unspezifische Testsequenz Ac-His-Val-Asn-Ser-Leu-Gly-Glu-Asn-Leu-Lys-Thr-Leu-Arg-Leu-Arg-βAla wurden jeweils parallel auf herkömmlichen Cellulose- und Polypropylenmembranen unter den Bedingungen der Spot-Synthese (siehe Beispiel 10) synthetisiert.

Nach Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen (2.5 h; 94% TFA, 3% TIPS, 2% H₂O, 1% Phenol) und Wäsche mit DCM (3 x), DMF (4 x) und Methanol (2 x) wurde die methanolfeuchte Membran 3 x 10 min mit Tris Buffered Saline (T-TBS) pH 8.0 gewaschen. Im Anschluß wurde die Membran mit Blockierungspuffer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) über 2 h inkubiert und dann 3 x 10 min mit T-TBS-Puffer (pH 8.0) gewaschen. Die so behandelte Membran wurde dann über 1 h mit Peroxidase- (POD) markiertem polyklonalen anti-Maus-IgG Antikörper inkubiert (0.1 µg/ml Blockierungspuffer). Die Antikörperlösung wurde verworfen und die Membran 3 x 10 min mit T-TBS-Puffer (TBS/Tween®20 pH 8.0) gewaschen. Abschließend wurde die Polymermembran mit einem Chemolumineszenz Substrat (Boehringer Mannheim) geschwenkt und Enzymaktivität mit dem Lumi-Imager (Boehringer Mannheim) aufgezeichnet.

| | |
|---------------------|---|
| λ | Lambda (Wellenlänge) |
| AA | Acrylsäure |
| Ac | Acetyl |
| Ac ₂ O | Essigsäureanhydrid |
| ACN | Acetonitril |
| ATR | Attenuated Total Reflection |
| BP | Benzophenon |
| Chem. Rev. | Chemical Reviews |
| d | Durchmesser |
| DABCO | Diazabicycloundecan |
| DCM | Dichlormethan |
| DIC | Diisopropylcarbodiimid |
| DIEA | Diisopropylethylamin |
| DMF | N,N'-Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| d _p | Porendurchmesser |
| ELISA | enzyme linked immunosorbent assay |
| Eq. | Äquivalent |
| Fmoc | 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl- |
| Fmoc- β Ala-F | N-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)- β -Alaninfluorid |
| FTIR | Fourier Transform Infrarot Spektroskopie |
| h | Stunden |
| HMBA | 4-Hydroxymethylbenzoesäure |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| i.w. | im wesentlichen |
| J. Am. Chem. Soc. | Journal of the American Chemical Society |
| Leu | Leucin |
| Lys | Lysin |
| M | Mol pro Liter |
| MeOH | Methanol |
| mM | millimolar |
| mm | Millimeter |
| MS | Massenspektrometrie |
| NMI | N-Methylimidazol |
| NMP | N-Methylpyrrolidon |
| OPfp | Pentafluorphenylester |
| PE | Polyethylen |
| PEG | Polyethylenglykol |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| PP | Polypropylen |
| prim. | primär |
| proz. | prozentig |
| REM | Rasterelektronenmikroskop |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| sek. | sekundär |
| β Ala | beta-Alanin |

| | |
|-------------------|--|
| TBTU | 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat |
| Tetrahedron Lett. | Tetrahedron Letters |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TIPS | Triisopropylsilan |
| Tyr | Tyrosin |
| opm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | volume by volume |

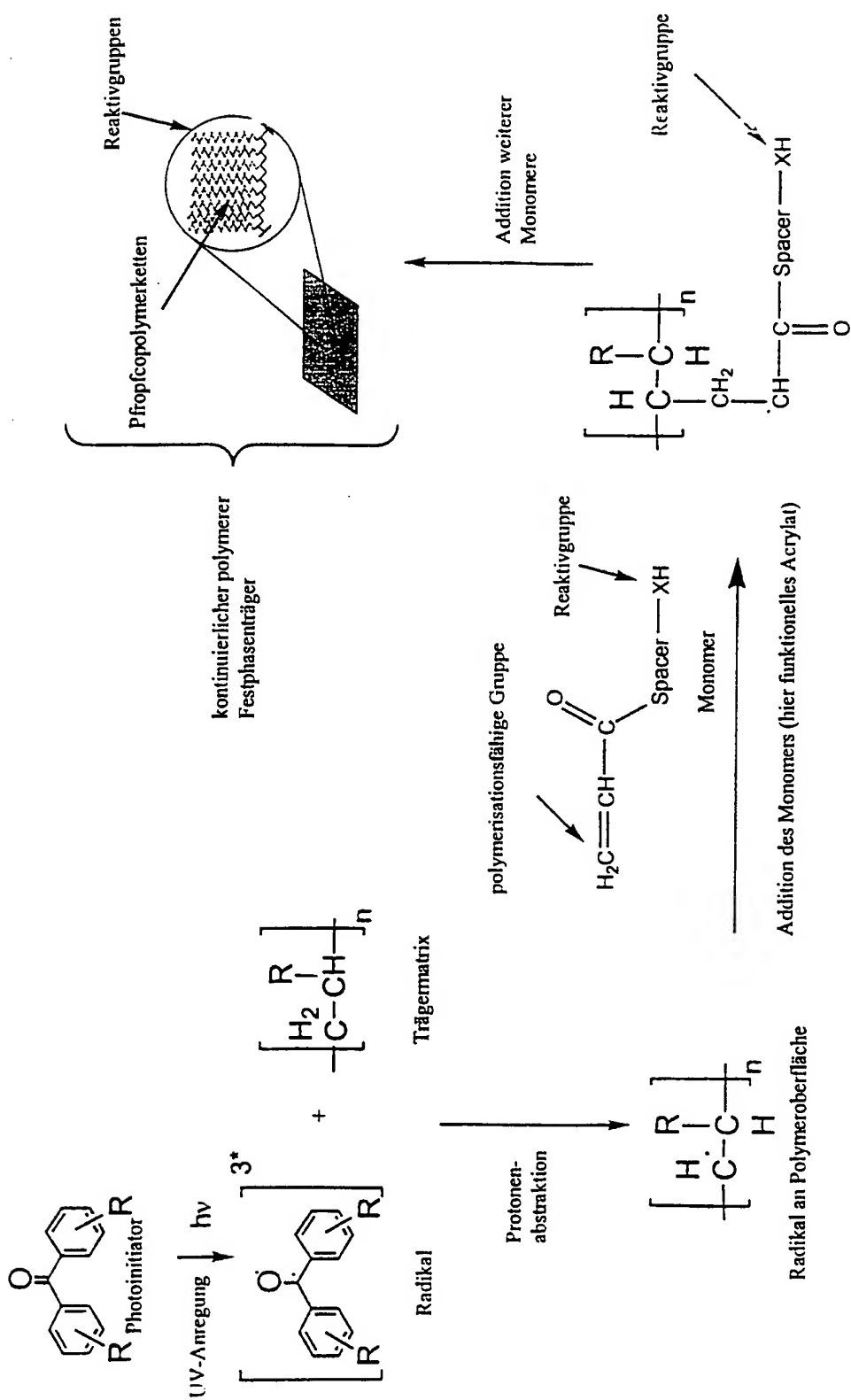
Patentansprüche

- 1 Verfahren zur Synthese von kontinuierlichen polymeren Festphasenträgern mit räumlich definierten und voneinander getrennten Reaktionsorten, umfassend eine Trägermatrix und Pfropfcopolymerketten mit Reaktivgruppen, die mit organischen Verbindungen reagibel sind, mit folgenden Syntheseschritten:
 - i.) Beschichten der Oberfläche der Trägermatrix mit einem Photoinitiator, welcher nach UV-Anregung, durch Wasserstoffabstraktion und damit ohne Polymerdegradation in der Matrix, an der Polymeroberfläche Radikale erzeugt,
 - wobei die Trägermatrix zur Gruppe mindestens einer der polymeren polyolefinischen Basispolymere gehört: Polypropylen, Polyethylen, Polyvinylidenfluorid, Polytetrafluorethylen oder vernetztes Polystyren, bevorzugt Polypropylen
 - wobei der Photoinitiator ein Benzophenonderivat oder Keton ist,
 - ii.) Belichten der mit Photoinitiator beschichteten Trägermatrix in Gegenwart eines ungesättigten funktionellen Monomers mit UV-Strahlung,
 - wobei das funktionelle Monomer eine Spacergruppe umfaßt, welche kovalent über eine Amid-, Ester-, Ether-, Disulfid- oder CC-Gruppe sowohl mit einer Reaktivgruppe als auch mit einer polymerisationsfähigen Gruppe verbunden ist,
 - (α) dabei ist der Spacer ein Oligo- oder Polyethylenglykol oder eine Bindung,
 - (β) dabei ist die polymerisationsfähige Gruppe ein Acrylat-, Vinyl- oder Allylmonomer,
 - (γ) dabei ist die Reaktivgruppe, die mit organischen Verbindungen reagibel ist, eine Hydroxylgruppe, Carboxylgruppe, Aminogruppe, Mercaptogruppe oder eine Halogengruppe,
 - (δ) dabei kann gegebenenfalls eine Bindung zwischen Reaktivgruppe und Spacer bzw. zwischen Spacer und polymerisationsfähiger Gruppe hydrolytisch oder oxidativ/reduktiv gespalten werden.
 - iii.) Bildung von Pfropfcopolymerketten durch kovalente Bindung der polymerisationsfähigen Gruppe der funktionellen Monomere an der Trägermatrix, wobei zunächst ein Monomer an ein Radikal der polymeren Trägermatrix addiert und dann an dieses Monomer weitere Monomere im Sinne einer Polymerisation addiert werden,
 - iv.) Extraktion von nicht umgesetzten funktionellem Monomer und Photoinitiator, sowie von löslichen Folgeprodukten.
- 2 Verwendung des kontinuierlichen Festphasenträgers, welcher nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1 hergestellt worden ist, für die parallele und kombinatorische Synthese von trägergebundenen oder freien Verbindungen, die durch sequentielles Spotten von aktivierten Synthesebausteinen an verschiedenen Reaktionsorten auf dem kontinuierlichen Festphasenträger synthetisiert werden,
 - die Peptide, Peptide, Peptomere, Oligogocarbamate, Oligoharnstoffe, Azatide, Ketide, Peptid-Sulfonamide, vinyloge Sulfonylpeptide, DNA's, und Peptid-Nukleinsäuren sind, oder die Verbindungen sind, bei denen an einer zentralen Kernstruktur durch sequentielles Spotten von Reagenzien variable Gruppen eingeführt werden,
 - und die Verbindungen sind, die durch einen Heterozyklisierungsschritt bzw. Mehrkomponentenreaktionen hergestellt werden, welche Benzodiazepine, Triazine, Triazole, Hydantoine, Cubane, Xanthine, Pyrrolidine, β-Laktame, Thiazolidone, Isoquinoline, Diketopiperazine sind,

-wobei jeweils jeder Ort auf dem kontinuierlichen Festphasenträger die Zusammensetzung der synthetisierten Verbindungen, die direkt über Reaktivgruppen der Pfropfcopolymerkette an der Trägermatrix gebunden sind, bestimmt.

- 3 Verwendung des kontinuierlichen Festphasenträgers nach Anspruch 1 für die parallele und kombinatorische Synthese von Proteinen.
- 4 Verwendung der kontinuierlichen Festphasenträger nach einem der vorherigen Ansprüche 2 bis 3 für die Festphasensynthese, vorzugsweise SPOT-Synthese auch als Array von identisch oder unterschiedlich funktionalisierten Trägern bzw. als Stapel von identisch oder unterschiedlich funktionalisierten Trägern für die Synthese von multipel oder graduell abspaltbaren Verbindungen, wobei durch Split (Single Sheets) & Combine (Stapel) Techniken mit ganzen Trägern auch eine quasi dreidimensionale Kombinatorik möglich wird.
- 5 Verwendung der kontinuierlichen Festphasenträger nach einem der vorherigen Ansprüche 2 bis 4 für die Identifizierung von Molekülen (Liganden) an synthetisierten Verbindungen, umfassend die folgenden Schritte:
Inkubation mit dem Liganden, Entfernen von überschüssigen Liganden durch Waschen, Detektion gebundener Liganden durch geeignete Verfahren wie: i) immunologische Nachweise, ii) Nachweis gebundener radioaktiv markierter Liganden, iii) Fluoreszenz- oder Chemolumineszenz-Nachweise, iv) biosensorische Nachweise.
- 6 Verwendung der kontinuierlichen Festphasenträger nach einem der vorherigen Ansprüche 2 bis 5 zur Untersuchung enzymatischer Aktivitäten an synthetisierten Verbindungen, umfassend die folgenden Schritte:
i.) Inkubation mit dem Enzym, ii.) Detektion enzymatischer Aktivität.

1/1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No
PCT/EP 99/06294

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08F255/02 C07K1/04 C08F259/08 C08F291/18 C08J7/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08F C07K C08J C09J G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| P,X | EP 0 872 512 A (HUELS CHEMISCHE WERKE AG) 21 October 1998 (1998-10-21) | 1 |
| Y | * column 4, line 42 - column 8, line 50 * column 12, line 40 - column 13, line 16; claims 19-22 | 2,3,5,6 |
| Y | --- WO 95 00533 A (RISØE FORSKNINGSCENTER ;BATSBERG PEDERSEN WALTER (DK); ALMDAL KRIS) 5 January 1995 (1995-01-05) * claims * abstract | 2,3,5,6 |
| P,X | EP 0 893 165 A (HUELS CHEMISCHE WERKE AG) 27 January 1999 (1999-01-27) | 1 |
| Y | * page 9, line 10 - 40 * page 7, line 55 - page 8, line 49; claims 21-23 | 2,3,5,6 |
| | --- -/-- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 December 1999

Date of mailing of the international search report

10/12/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hammond, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/06294

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | WO 95 09176 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC) 6 April 1995 (1995-04-06) cited in the application * page 1, line 1 - page 19, line 32; claims 1,4,9-17, 22 * abstract | 2,3,5,6 |
| P,X | EP 0 893 164 A (HUELS CHEMISCHE WERKE AG) 27 January 1999 (1999-01-27) | 1 |
| Y | * page 10, line 46 - page 11, line 20; claims 1-20 * abstract | 2,3 |
| Y | WO 92 04384 A (UNIV MINNESOTA) 19 March 1992 (1992-03-19) * claims 1-11; abstract * page 13, line 25 -page 14, line 12 | 2,3 |
| A | ZHANG PEI YAO ET AL: "SURFACE MODIFICATION BY CONTINUOUS GRAFT COPOLYMERIZATION. \I. PHOTOINITIATED GRAFT COPOLYMERIZATION ONTO POLYETHYLENE TAPE FILM SURFACE" JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE,US,JOHN WILEY AND SONS INC. NEW YORK, vol. 40, no. 9 / 10, page 1647-1661 XP000162051 ISSN: 0021-8995 the whole document | 1 |
| A | EP 0 860 213 A (HUELS CHEMISCHE WERKE AG) 26 August 1998 (1998-08-26) * page 4, line 7-10 * page 5, line 54 -page 6. line 16 | 1-3 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. l. Application No

PCT/EP 99/06294

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0872512 A | 21-10-1998 | DE 19715449 A | 15-10-1998 |
| | | DE 19732586 A | 04-02-1999 |
| | | DE 19754565 A | 10-06-1999 |
| | | CA 2234538 A | 14-10-1999 |
| | | JP 10298320 A | 10-11-1998 |
| WO 9500533 A | 05-01-1995 | AU 6995694 A | 17-01-1995 |
| | | EP 0703921 A | 03-04-1996 |
| | | US 5886104 A | 23-03-1999 |
| EP 0893165 A | 27-01-1999 | DE 19809042 A | 07-01-1999 |
| | | CA 2241504 A | 28-12-1999 |
| | | JP 11099362 A | 13-04-1999 |
| | | NO 983014 A | 29-12-1998 |
| WO 9509176 A | 06-04-1995 | AU 671688 B | 05-09-1996 |
| | | AU 5294493 A | 18-04-1995 |
| | | EP 0721458 A | 17-07-1996 |
| EP 0893164 A | 27-01-1999 | DE 19809054 A | 07-01-1999 |
| | | CA 2241483 A | 28-12-1999 |
| | | JP 11080394 A | 26-03-1999 |
| | | NO 983012 A | 29-12-1998 |
| WO 9204384 A | 19-03-1992 | DE 69120821 D | 14-08-1996 |
| | | DE 69120821 T | 23-01-1997 |
| | | DE 69130333 D | 12-11-1998 |
| | | DE 69130333 T | 04-03-1999 |
| | | EP 0546055 A | 16-06-1993 |
| | | EP 0687691 A | 20-12-1995 |
| | | EP 0801082 A | 15-10-1997 |
| | | JP 6500331 T | 13-01-1994 |
| | | US 5545698 A | 13-08-1996 |
| | | US 5235028 A | 10-08-1993 |
| EP 0860213 A | 26-08-1998 | DE 19700081 A | 09-07-1998 |
| | | DE 19700082 A | 09-07-1998 |
| | | DE 19700083 A | 09-07-1998 |
| | | DE 19732588 A | 04-02-1999 |
| | | CA 2226132 A | 03-07-1999 |
| | | JP 10249277 A | 22-09-1998 |
| | | NO 980018 A | 06-07-1998 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06294

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C08F255/02 C07K1/04 C08F259/08 C08F291/18 C08J7/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C08F C07K C08J C09J G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| P,X | EP 0 872 512 A (HUELS CHEMISCHE WERKE AG) 21. Oktober 1998 (1998-10-21) | 1 |
| Y | * Spalte 4, Zeile 42 - Spalte 8, Zeile 50* Spalte 12, Zeile 40 - Spalte 13, Zeile 16; Ansprüche 19-22 | 2,3,5,6 |
| Y | WO 95 00533 A (RISØE FORSKNINGSCENTER ;BATSBERG PEDERSEN WALTER (DK); ALMDAL KRIS) 5. Januar 1995 (1995-01-05) * Ansprüche * Zusammenfassung | 2,3,5,6 |
| P,X | EP 0 893 165 A (HUELS CHEMISCHE WERKE AG) 27. Januar 1999 (1999-01-27) | 1 |
| Y | * Seite 9, Zeile 10 - 40 * Seite 7, Zeile 55 - Seite 8, Zeile 49; Ansprüche 21-23 | 2,3,5,6 |
| | -/- | |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Dezember 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

10/12/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hammond, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. ationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06294

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| Y | WO 95 09176 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC) 6. April 1995 (1995-04-06) in der Anmeldung erwähnt * Seite 1, Zeile 1 - Seite 19, Zeile 32 ; Ansprüche 1,4,9-17,22 * Zusammenfassung --- | 2,3,5,6 |
| P,X | EP 0 893 164 A (HUELS CHEMISCHE WERKE AG) 27. Januar 1999 (1999-01-27) | 1 |
| Y | * Seite 10, Zeile 46 - Seite 11, Zeile 20 ; Ansprüche 1-20 * Zusammenfassung --- | 2,3 |
| Y | WO 92 04384 A (UNIV MINNESOTA) 19. März 1992 (1992-03-19) * Ansprüche 1-11 ; Zusammenfassung * Seite 13, Zeile 25 -Seite 14, Zeile 12 --- | 2,3 |
| A | ZHANG PEI YAO ET AL: "SURFACE MODIFICATION BY CONTINUOUS GRAFT COPOLYMERIZATION. \I. PHOTOINITIATED GRAFT COPOLYMERIZATION ONTO POLYETHYLENE TAPE FILM SURFACE" JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE,US,JOHN WILEY AND SONS INC. NEW YORK, Bd. 40, Nr. 9 / 10, Seite 1647-1661 XP000162051 ISSN: 0021-8995 das ganze Dokument --- | 1 |
| A | EP 0 860 213 A (HUELS CHEMISCHE WERKE AG) 26. August 1998 (1998-08-26) * page 4, Zeile 7-10 * Seite 5, Zeile 54 -Seite 6, Zeile 16 ----- | 1-3 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06294

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| EP 0872512 A | 21-10-1998 | DE 19715449 A | 15-10-1998 |
| | | DE 19732586 A | 04-02-1999 |
| | | DE 19754565 A | 10-06-1999 |
| | | CA 2234538 A | 14-10-1999 |
| | | JP 10298320 A | 10-11-1998 |
| WO 9500533 A | 05-01-1995 | AU 6995694 A | 17-01-1995 |
| | | EP 0703921 A | 03-04-1996 |
| | | US 5886104 A | 23-03-1999 |
| EP 0893165 A | 27-01-1999 | DE 19809042 A | 07-01-1999 |
| | | CA 2241504 A | 28-12-1999 |
| | | JP 11099362 A | 13-04-1999 |
| | | NO 983014 A | 29-12-1998 |
| WO 9509176 A | 06-04-1995 | AU 671688 B | 05-09-1996 |
| | | AU 5294493 A | 18-04-1995 |
| | | EP 0721458 A | 17-07-1996 |
| EP 0893164 A | 27-01-1999 | DE 19809054 A | 07-01-1999 |
| | | CA 2241483 A | 28-12-1999 |
| | | JP 11080394 A | 26-03-1999 |
| | | NO 983012 A | 29-12-1998 |
| WO 9204384 A | 19-03-1992 | DE 69120821 D | 14-08-1996 |
| | | DE 69120821 T | 23-01-1997 |
| | | DE 69130333 D | 12-11-1998 |
| | | DE 69130333 T | 04-03-1999 |
| | | EP 0546055 A | 16-06-1993 |
| | | EP 0687691 A | 20-12-1995 |
| | | EP 0801082 A | 15-10-1997 |
| | | JP 6500331 T | 13-01-1994 |
| | | US 5545698 A | 13-08-1996 |
| | | US 5235028 A | 10-08-1993 |
| EP 0860213 A | 26-08-1998 | DE 19700081 A | 09-07-1998 |
| | | DE 19700082 A | 09-07-1998 |
| | | DE 19700083 A | 09-07-1998 |
| | | DE 19732588 A | 04-02-1999 |
| | | CA 2226132 A | 03-07-1999 |
| | | JP 10249277 A | 22-09-1998 |
| | | NO 980018 A | 06-07-1998 |